

Title	デヒドロアスコルビン酸のピロールによる呈色反応に関する分析化学的研究
Author(s)	河内, 敬朝
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	http://hdl.handle.net/11094/29938
DOI	
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名・(本籍)	河 内 敬 朝
学位の種類	薬 学 博 士
学位記番号	第 2015 号
学位授与の日付	昭和 45 年 3 月 30 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 2 項該当
学位論文題目	デヒドロアスコルビン酸のピロールによる呈色反応に関する分析化学的研究
論文審査委員	(主査) 教授 川崎近太郎 (副査) 教授 吉岡 一郎 教授 田村 恭光 教授 枅井雅一郎

論 文 内 容 の 要 旨

緒 言

アスコルビン酸 (AsA) を確認する方法としては過マンガン酸カリウムまたは 2,6-Dinitrophenolindo phenol の脱色による方法および硝酸銀またはフェリング試液より黒色あるいは赤色の沈殿を生成検出する方法などがあるが、これらはいずれも AsA のもつ還元性を応用したものであるから他の還元性物質の影響を受けやすい。ところが AsA を酸化してデヒドロアスコルビン酸 (DAsA) とし、本化合物の持つ Carbonyl 基の特性を利用した、Roe の 2,4-Dinitrophenylhydrazine 法および小川の O-Phenylenediamine によるけい光法などは特異性において前者より優れているが、いずれも公定書には収載されていない。

ところが米国薬局方には、AsA のトリクロル酢酸溶液 (AsA 1 mg/ml) に活性炭を加えて酸化して DAsA とし、これにピロール 1 滴を作用させて呈する青色を以って確認する方法すなわち Tipson 法が AsA の確認試験として収載されている。

著者は、たまたま日本薬局方の改正にともない AsA の確認試験を検討する機会を得たので、上記の事実に着目して本研究に着手し、確認試験法を確立し、またピロールによる AsA の新しい比色定量法を案出し、さらに反応機構を解明し、呈色物質の構造を明らかにせんと試みた。

〔I〕 アスコルビン酸ピロール呈色反応

Tipson 法を追試し、酸化剤として活性炭の代わりにヨウ素液も用いることとし、反応液の至適 pH を定め、その pH 1.1~1.4 を保つためには 5%トリクロル酢酸より 5%メタリン酸溶液の方が適当であることを明らかにした。

本反応の特異性については表 1 および表 2 に示す AsA 誘導体および関連化合物、表 3 に

AsA 誘導体および関連化合物のピロールによる呈色

表1

化合物名	構造式	呈色
D-Arabo-AsA	$ \begin{array}{c} \text{CO} \\ \\ \text{HO} \text{C} \text{---} \text{O} \\ \quad \\ \text{HO} \text{C} \quad \text{O} \\ \quad \\ \text{HC} \quad \text{O} \\ \\ \text{HO} \text{CH} \\ \\ \text{CH}_2 \text{OH} \end{array} $	青色
6-O-Acetyl-AsA	$ \begin{array}{c} \text{CO} \\ \\ \text{HO} \text{C} \text{---} \text{O} \\ \quad \\ \text{HO} \text{C} \quad \text{O} \\ \quad \\ \text{HC} \quad \text{O} \\ \\ \text{HO} \text{CH} \\ \\ \text{CH}_2 \text{OCOCH}_3 \end{array} $	青色
6-O-Benzoyl-AsA	$ \begin{array}{c} \text{CO} \\ \\ \text{HO} \text{C} \text{---} \text{O} \\ \quad \\ \text{HO} \text{C} \quad \text{O} \\ \quad \\ \text{HC} \quad \text{O} \\ \\ \text{HO} \text{CH} \\ \\ \text{CH}_2 \text{OCOC}_6\text{H}_5 \end{array} $	青色
5,6-O-Diacetyl-AsA	$ \begin{array}{c} \text{CO} \\ \\ \text{HO} \text{C} \text{---} \text{O} \\ \quad \\ \text{HO} \text{C} \quad \text{O} \\ \quad \\ \text{HC} \quad \text{O} \\ \\ \text{CH}_3 \text{COOCH} \\ \\ \text{CH}_2 \text{OCOCH}_3 \end{array} $	青色
Diacetyl-DAsA Dimer	—	呈色せず
5,6-Isopropylidene-AsA	$ \begin{array}{c} \text{CO} \\ \\ \text{HO} \text{C} \text{---} \text{O} \\ \quad \\ \text{HO} \text{C} \quad \text{O} \\ \quad \\ \text{HC} \quad \text{O} \\ \\ \text{HCO} \text{---} \text{C} \text{---} \text{CH}_3 \\ \quad \\ \text{HCO} \text{---} \text{C} \text{---} \text{CH}_3 \end{array} $	青色
Triose reductone	$ \begin{array}{c} \text{CHO} \\ \\ \text{HO} \text{C} \\ \\ \text{HO} \text{CH} \end{array} $	青紫色
3,4-Dihydroxy-5-methyl-tetrone	$ \begin{array}{c} \text{CO} \\ \\ \text{HO} \text{C} \text{---} \text{O} \\ \quad \\ \text{HO} \text{C} \quad \text{O} \\ \quad \\ \text{HC} \quad \text{O} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array} $	青紫色

表2

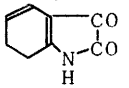
化合物名	構造式	呈色
2,3-Diketo-gulonic acid	$ \begin{array}{c} \text{COOH} \\ \\ \text{CO} \\ \\ \text{CO} \\ \\ \text{HCOH} \\ \\ \text{HOCH} \\ \\ \text{CH}_2 \text{OH} \end{array} $	5分後呈色せず 30分後青色
2-Keto-gulonic acid	$ \begin{array}{c} \text{COOH} \\ \\ \text{CO} \\ \\ \text{HOCH} \\ \\ \text{HCOH} \\ \\ \text{HOCH} \\ \\ \text{CH}_2 \text{OH} \end{array} $	呈色せず
L-Sorbose	$ \begin{array}{c} \text{CH}_2 \text{OH} \\ \\ \text{CO} \\ \\ \text{HOCH} \\ \\ \text{HCOH} \\ \\ \text{HOCH} \\ \\ \text{CH}_2 \text{OH} \end{array} $	呈色せず
2,3,5,6-O-Tetrabenzoyl-AsA	$ \begin{array}{c} \text{CO} \\ \\ \text{C}_6\text{H}_5 \text{COO} \text{C} \text{---} \text{O} \\ \quad \\ \text{C}_6\text{H}_5 \text{COO} \text{C} \quad \text{O} \\ \quad \\ \text{HC} \quad \text{O} \\ \\ \text{C}_6\text{H}_5 \text{COOCH} \\ \\ \text{CH}_2 \text{OCOC}_6\text{H}_5 \end{array} $	呈色せず
2,6-Diethoxycarbonyl-AsA	$ \begin{array}{c} \text{CO} \\ \\ \text{C}_2\text{H}_5 \text{COO} \text{C} \text{---} \text{O} \\ \quad \\ \text{HO} \text{C} \quad \text{O} \\ \quad \\ \text{HC} \quad \text{O} \\ \\ \text{HOCH} \\ \\ \text{CH}_2 \text{OCOC}_2\text{H}_5 \end{array} $	呈色せず
3-Methyl-AsA	$ \begin{array}{c} \text{CO} \\ \\ \text{HO} \text{C} \text{---} \text{O} \\ \quad \\ \text{CH}_3 \text{OC} \quad \text{O} \\ \quad \\ \text{HC} \quad \text{O} \\ \\ \text{HOCH} \\ \\ \text{CH}_2 \text{OH} \end{array} $	呈色せず

[注]表1 反応条件：試料50mg+5% HPO_3 50ml
+0.1Nヨウ素液酸化→5ml+ピロール0.05ml
50° 5分間→呈色

表2 反応条件：試料50mg+5% HPO_3 50ml
50° 5分間→5ml+ピロール0.05ml 50° 5分間→呈色

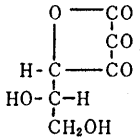

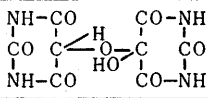
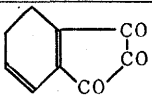
Dicarbonyl化合物のピロールによる呈色

表3

化合物名	構造式	呈色
Isatin		青色
Glyoxal	$\begin{array}{c} \text{H}-\text{C}=\text{O} \\ \\ \text{H}-\text{C}=\text{O} \end{array}$	青紫色
Diacetyl	$\begin{array}{c} \text{CH}_3-\text{C}=\text{O} \\ \\ \text{CH}_3-\text{C}=\text{O} \end{array}$	呈色せず
Benzil	$\begin{array}{c} \text{C}_6\text{H}_5-\text{C}=\text{O} \\ \\ \text{C}_6\text{H}_5-\text{C}=\text{O} \end{array}$	呈色せず

Tricarbonyl化合物のピロールによる呈色

表4

化合物名	構造式	呈色
Dehydro-L-Ascorbic Acid (DAsA)		青色
Alloxan		青色
Alloxantin		淡青色 →青色
Ninhydrin		緑色 →灰かっ色



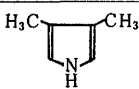
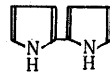
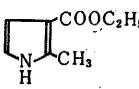
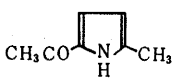
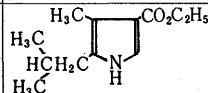
[注] 反応条件：試料50mg+5% HPO_3 50ml → 5ml
+ピロール0.05ml $\xrightarrow{50^\circ 5\text{分}}$ 青色

示す Dicarbonyl 化合物および表4に掲げる Tricarbonyl 化合物について検討した結果、ヨウ素酸化によって Tricarbonyl 化合物になりうる Endiol 基を有するもの(*)は呈色するが、Endiol 基の -OH の双方またはいずれかに置換基を有するもの(**)は呈色しないこと、表3のごとき Tricarbonyl 化合物および表4に示すイサチン、グリオキサールのような Dicarbonyl 化合物も呈色することから本反応は隣接する2個ないし3個の Carbonyl 基を有する化合物に共通の反応である。したがってピロールは DAsA のばあいはその2位または3位の Carbonyl 基と結合するものと考えられる。

一方種々のピロール誘導体(表5)をピロールの代わりに用いて呈色反応を行なった結果、 α 、 α' 位に置換基を有しないピロール誘導体(*)および Dipyrrol が呈色を示すことから、DAsA

AsAのピロール誘導体による呈色

表5

化合物名	構造式	呈色
N-Methyl-pyrrole		呈色せず
2-Methyl-pyrrole		呈色せず
3,4-Dimethyl-pyrrole		青色
Dipyrrol		青色
Ethyl-2-methyl-3-pyrrole carboxylate		呈色せず
2,4-Dimethyl-5-acetylpyrrole		呈色せず
4-Methyl-5-isobutyl-3-carboxy pyrrole		呈色せず

[注] 反応条件：AsA100mg+5% HPO_3 100ml
+0.1N I_2 酸化 → 5ml+ピロール誘導体
 $\xrightarrow{50^\circ 5\text{分}}$ 呈色

の Carbonyl 基がピロールの α , α' 位において結合するものと思われる。

したがって本反応はピロール 1 分子と DAsA 2 分子かまたはピロール 2 分子と DAsA 2 分子が結合し Indophenin 類似の構造をとるものと予想される。

〔Ⅱ〕 AsA の銅塩ピロール呈色反応

著者は、前記のとおり、Tipson 法を改め、酸化剤にヨウ素液を、反応液に用いる酸としてメタリン酸を用いて実験を行なって来たが、この改訂法でも常に鮮明な青色を呈するとは限らず、Tipson 法同様、青緑色～緑色を呈することがある。

日本薬局方に本反応を収載するためには呈色を一層鮮明化しかつ安定化する必要があると考え、反応の条件の検討を行なった結果、酸性白土を添加すると鮮明な青色が得られるばかりでなく、いちじるしく呈色が増強されることを見出し、この現象が酸性白土中に含有される微量の 3 価の鉄イオンの作用に基づくことを確認し、さらに 2 価の銅イオンにも同じような作用があることを認めた。

そこで 2 価の銅イオンとして 0.1% 硫酸銅溶液を用いることとして、日本薬局方の AsA の確認試験法を確立した。

つぎに 2 価の銅イオンの本反応における役割について検討した。まず 2 価の銅イオンの共存は表 6 に示すように添加する時期に関係なく鮮明な青色を与えることを知り、つぎに呈色の経過を Rapidsan 分光光度計で経時的に測定したところ、図 5、図 6 に示すように銅イオンも添加しないときは吸収極大が $420m\mu$ および $680m\mu$ にあって青緑色を呈するが、銅イオンを添加したばあいは $420m\mu$ の吸収が消失し、吸収極大が $620m\mu$ に移動することを確認した。

この単一の吸収極大を持つ呈色が得られたことは定量法確立の可能性を示唆するものと考えられる。

以上の事実から銅イオンは色素と錯塩を形成するものと推定される。

つぎに本呈色反応を定量法へ応用するために、至適な試料の濃度、試薬の量、反応時間および温度を定め、反応終了後 10° に冷却することにより副反応の進行を防ぐことによって、 $615m\mu$ の単一波長で AsA を比色する定量法を確立することができた。そして本法を局方 AsA 製剤に応用し、良好な結果を得、また総合ビタミン剤にも応用し、液剤（ドリンク剤）錠剤とも実用的な定量結果を得た。

したがって本定量法は感度の点において他の AsA の比色定量法に劣るが、薬剤のように高濃度の試料のばあいは操作が簡便な点で十分利用価値があると考えられる。

呈色反応におけるCu²⁺の影響と添加時期

表6

試料溶液	呈色操作順序 DAsA濃度	0.1%CuSO ₄	ピロール	加熱条件	0.1%CuSO ₄	色調 (10分後)	比色時の最終DAsA濃度	極大波長 吸光度
AsAの活性炭 1) 酸化トリクロル酢酸溶液	5mg / 5ml	—	0.05ml	50°5分	—	青緑色	2.5mg / 5ml	680mμ 0.6
AsAのヨウ素酸 2) 化DAsAのメタリン酸溶液	"	—	"	"	—	"	"	680mμ 0.4
3) "	"	1 滴	"	"	—	鮮明な青色	"	620mμ 1.3
4) "	"	—	"	"	1 滴	"	"	620mμ 1.3
備考	1) Tipson法 2) 著者改訂(Cu ²⁺ 無添加)法				3) 4) 著者改訂(Cu ²⁺ 添加)法			

Rapidscan分光光度計による呈色の時間的变化

図5

試料AsA 1mg/ml

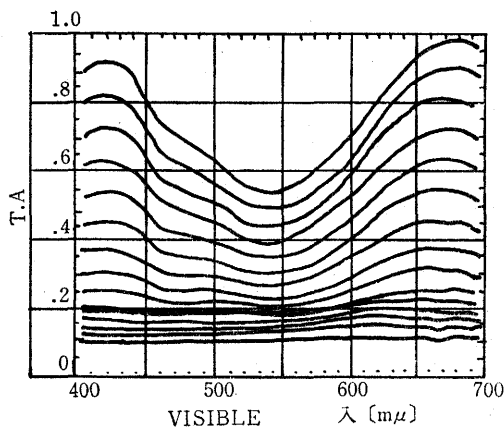
Cu²⁺の影響

試料AsA 1mg/ml

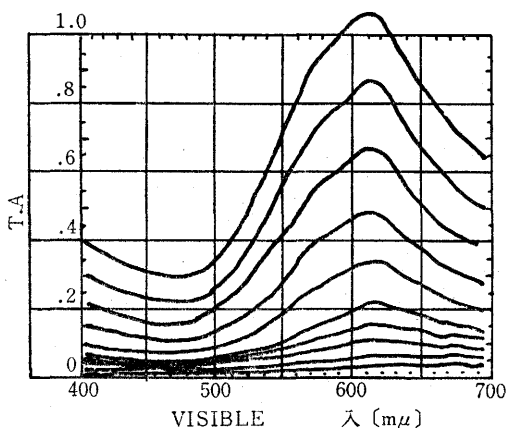
図6

・ Cu²⁺を添加しない場合

Cu²⁺を添加した場合



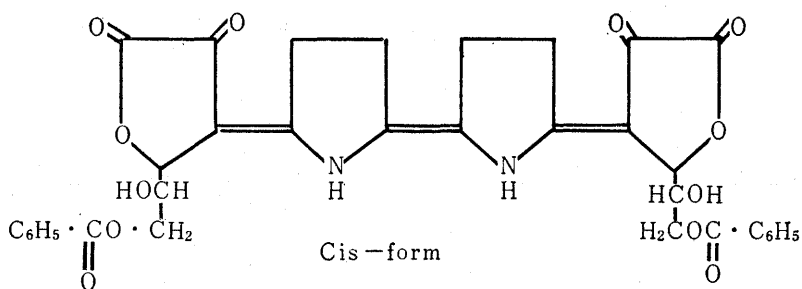
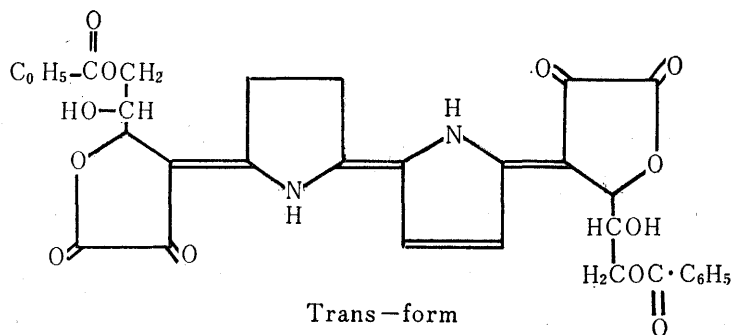
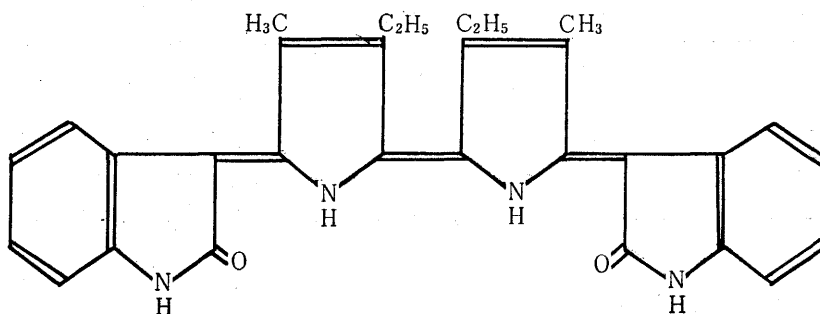
[注] ▲ 反応開始時11分40秒まで測定
▲ 測定間隔50秒
▲ 5分後の吸光度≒0.15(620mμ)



[注] ▲ 反応開始後8分30秒まで測定
▲ 測定間隔50秒
▲ 5分後の吸光度≒0.35(620mμ)

〔Ⅲ〕 呈色色素の単離による呈色機構の解明

AsA をメタリン酸溶液中においてヨウ素酸化して DAsA とし、ピロールを反応させて得られる色素は、水、有機溶媒に不溶性であるため、精製単離ができなかったので有機溶媒に可溶性の色素をうるために AsA の代わりに 6-O-Benzoyl-AsA を用いたところ、これから得られる色素は酢酸エチル、アセトンおよびエタノールなどの有機溶媒によく溶け、かつ安定であることを確



認したので、6-O-Benzoyl-AsA を原料として呈色操作を行なって得た色素について TLC を行なったところ、青色、赤紫色、緑色など5～6個のスポットを検出した。したがって本反応は単なる反応ではなく、他の副生成物をともなう反応であることが明らかになった。

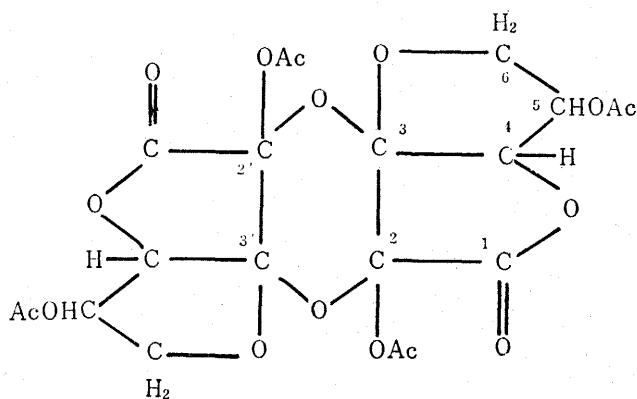
そこでその主成分である青色色素をカラムクロマトグラフィーによって分離し、このものの元素分析値および分子量の測定値と Pratesi がイサチンとピロールの反応の際生成する青色色素に対して提示した構造式から類推し、また著者の得た置換基の影響を検討した結果に基づいて図7-a, 図7-b の構造式を予想したが, IR, NMR スペクトルの結果からは本式を支持するに足る根拠は得られなかった。

〔Ⅳ〕 Diacetyl-DAsA の2量体と呈色反応

前記において有機溶媒に可溶性の色素をうるために AsA 誘導体たとえば 6-O-Benzoyl-AsA を用いたが、これに先立って同様の色素を得る目的で 5,6-Diacetyl-DAsA の合成を試みた。

合成法としては、5,6-Diacetyl-AsA を酸化するか、DAsA をアセチル化するか2方法が考えられる。ところが前の方法は、酸化剤にヨウ素、二酸化セレンまたはパラキノンのいずれを用いても相当する Dehydro 体の結晶を得ることができなかったが、後の方法により、DAsA をピリジン中で無水酢酸を反応させるかまたは硫酸触媒で無水酢酸を反応させてアセチル化すると、容易に DAsA のアセチル体の無色結晶 mp 256～257° を得ることができたので、このアセチル体にピロールを反応させたところ、意外にも呈色を示さなかった。

そこでその原因を追求する目的でこのアセチル体のもつ種々の理化学的性質を調べ、このものが Albers がすでに 1963年、Bis-DAsA (無色結晶 mp 227°) をアセチル化して得た Tetraacetyl-bis-DAsA と同一物質であるかどうかを比較検討し、さらにマスペクトル、IR スペクトルおよび NMR スペクトルの測定を行ない、彼らが提示した構造式(図8)について考察を加えた結果本式を支持しても矛盾がないと思われる。



Tetraacetyl-bisDAsA (Albers)

一方この物質が呈色を示さないのは、構造にみられるように Diacetyl-DAsA 2分子がそれぞれ 2,3' 位および 3,2' 位において Dioxane 環を形成しているためであって、このことは DAsA の 2 位または 3 位の Carbonyl 基がピロールの α 位において結合するという前記の推定を裏付けるものである。

結 論

AsA のトリクロル酢酸溶液に活性炭を加えて酸化して DAsA としたのち、ピロールを作用させて呈色させる Tipson 法 (U.S.P 法) を追試し、本反応は DAsA を初め隣接する 3 個の Carbonyl 基を有する化合物および一部の Dicarbonyl 化合物に共通な反応であることを明らかにした。

本反応において活性炭の代わりに酸性白土を用いると鮮明な青色が得られるばかりでなく、呈色が増強されることを見出し、その原因が酸性白土中に含有される 3 価の鉄イオンの作用に基づくことを確認し、さらに 2 価の銅イオンにも同じ作用があることを認めた。

そこで 2 価の銅イオンとして 0.1% 硫酸銅液を用いることとして、Tipson 法を改良し、AsA をメタリン酸液中でヨウ素酸化し、DAsA とし、0.1% 硫酸銅液 1 滴、ピロール 1 滴を加えて呈色させる方法を案出し、現行日本薬局方の AsA 確認試験法を確立した。

そして本反応における銅イオンの役割について検討した結果、溶液中において色素の銅錯塩が形成されるため、呈色の強度が増大、極大波長が移動するものと推定した。

つぎに本呈色反応を定量法へ応用するために至適な試料の濃度、試液の量、反応時間および温度を定め、冷却することにより、副反応などの進行を防ぐことによって、615 m μ の単一波長で AsA を比色する定量法を確立することができた。

そして本法を局方製剤に応用し、良好な結果を得、また総合ビタミン剤に応用し、液剤（ドリンク剤）錠剤ともに実用的な定量結果を得た。

さらに本反応において生成する色素の構造については、AsA から得られる色素は不溶性であるため分離することができなかったが、6-O-Benzoyl-AsA から得られる色素は可溶性であるため、C.P.C によって精製単離して元素分析、分子量測定を行ない構造式を予想したが、IR, NMR スペクトル測定の結果から予想式を支持することはできなかった。

なお上述の呈色色素を検討した際 DAsA をアセチル化して得られるアセチル体は本呈色反応に対して陰性であることを見出し、その原因は、この DAsA のアセチル体が Albers の得た Tetraacetyl-bis-DAsA すなわち Diacetyl-DAsA の 2 量体と同一物であることを認めた。ついて IR スペクトル、NMR スペクトルの結果、Albers の提示した構造式は著者の得た値と一応矛盾しないものと認めるに至った。

論文の審査結果の要旨

Tipson の呈色反応を改良してデヒドロアスコルビン酸とピロールとの反応を銅イオンの存在下に行なうと安定な青色を呈し定量方法として使用できることを明かにした。

Tipson 反応の呈色色素の分離分析を行ない呈色機構への考察を加えジアセチルデヒドロアスコルビン酸の Dimer をも解明した。

よって、本論文は薬学博士の学位を授与するに値するものと認める。